

SEPARATION OF POLY (BETA-HYDROXY BUTYRIC ACID) FROM BACTERIAL CELL

Publication number: JP57065193

Also published as:

Publication date: 1982-04-20

US4358583 (A)

Inventor: JIYON UOOKAA; JIYONASAN RICHIYAADO
HOITSUTON; BAARII ARUDAASON

Applicant: ICI LTD

Classification:

- international: C12P7/62; C12P7/62; (IPC1-7): C12P7/42

- european: C12P7/62A

Application number: JP19810127312 19810813

Priority number(s): GB19800026460 19800813

[Report a data error](#) [he](#)

Abstract not available for JP57065193

Abstract of corresponding document: [US4358583](#)

Poly (beta -hydroxy butyric acid), PHB, is extracted from a suspension of bacterial cells by causing the cells to flocculate, by pH modification, optionally with heating, and then extracting the PHB from the flocculated cells with a suitable extraction solvent. Flocculation of the cells renders subsequent separation of the PHB solution from the cell debris more facile. Preferably lipids are extracted from the flocculated cells before contact with the PHB extraction solvent.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭57-65193

⑫ Int. Cl.³
C 12 P 7/42

識別記号
6760-4B

⑬ 公開 昭和57年(1982)4月20日
発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ 菌体からのポリ(β-ヒドロキシ酪酸)の分離方法

ツトン

イギリス国クリーブランド・ス

⑫ 特 願 昭56-127312

トツクトン・オン・テイズ・
ノートン・ザ・グリーン・ノー
トン・ホール(番地なし)

⑬ 出 願 昭56(1981)8月13日

⑭ 出願人 インペリヤル・ケミカル・イン
ダストリーズ・リミテッド

優先権主張 ⑮ 1980年8月13日 ⑯ イギリス
(GB) ⑰ 8026460

イギリス国ロンドン市エスダブ
リュー1ビー3ジエイエフ・ミ
ルバンク・インペリヤル・ケミ
カル・ハウス(番地なし)

⑭ 発明者 ジヨン・ウォーカー

⑮ 代理人 弁理士 湯浅恭三 外2名

イギリス国クリーブランド・ス
トツクトン・オン・テイズ・
ノートン・ザ・グリーン・ノー
トン・ホール(番地なし)

⑭ 発明者 ジヨナサン・リチャード・ホイ

最終頁に続く

明細書

1.【発明の名称】

菌体からのポリ(β-ヒドロキシ酪酸)の分離方法

2.【特許請求の範囲】

(1) ポリ(β-ヒドロキシ酪酸)を含む菌体の菌体を、ポリ(β-ヒドロキシ酪酸)を可溶化剤と併用させ、そしてポリ(β-ヒドロキシ酪酸)を溶解して含む可溶剤を菌体破片屑から分離することにより、ポリ(β-ヒドロキシ酪酸)含有菌体の水性懸濁液からポリ(β-ヒドロキシ酪酸)を分離する方法であつて：水性懸濁液中の菌体を、懸濁液のpHを酸での処理により2～5の範囲内の値に下げる工程と、それと組合せた(1)上記酸化化前に水性懸濁液のpHを8～12の範囲内の値に上げるため水性懸濁液をアルカリで処理する工程および(1)上記酸化化の最もくは後に水性懸濁液を5.0～20.0℃の範囲内の温度に加熱する工程の少なくとも一方とによつて、溶解させ；次いで菌体を水性懸濁液から分離してからその菌

体を抽出溶剤と混合させる；ことを特徴とする菌体の菌体からのポリ(β-ヒドロキシ酪酸)の分離方法。

(2) 懸濁液のpHを8.5～12の範囲内の値に上げ；その懸濁液中に加圧下のスチームを射出することにより加熱し；次いで懸濁液を3～5の範囲内の95℃まで酸化化する；ことにより懸濁液中の菌体を溶解させることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の方法。

(3) 菌体懸濁液をスチームの射出により60～100℃の範囲内の温度に加熱することを特徴とする特許請求の範囲第1または2項に記載の方法。

(4) ポリ(ヒドロキシ酪酸)抽出用溶剤前に、菌体の菌体に溶解した溶質を、該溶質を溶解し得るがポリ(ヒドロキシ酪酸)を溶解し難い溶剤との接触により菌体から抽出し、そして溶質を溶解して含む該溶剤を菌体から分離除去することを特徴とする特許請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の方法。

(5) 菌体懸濁液を50～90℃の範囲内の温度で加

質抽出用溶剤と接触させる特許請求の範囲第も項に記載の方法。

(b) 脂質抽出用溶剤はアセトンまたはメタノールである特許請求の範囲第もまたは5項に記載の方法。

(7) 脂質抽出後かつボリ(β-ヒドロキシ脂肪)抽出用溶剤との接触前に、被膜液体を乾燥させることにより多孔性微粒状物とし、これをボリ(β-ヒドロキシ脂肪)抽出用溶剤と接触させることを特徴とする特許請求の範囲第4～6項のいずれかに記載の方法。

(8) 被膜液体を脂質抽出溶剤から分離後に、被膜液体を水でスラリー化してからボリ(β-ヒドロキシ脂肪)抽出用溶剤と接触させることを特徴とする特許請求の範囲第4～6項のいずれかに記載の方法。

(9) ボリ(β-ヒドロキシ脂肪)抽出用溶剤はクロロホルム、1,2-ジクロルエタンおよび塩化メチレンから選択されたものである特許請求の範囲第1～8項のいずれかに記載の方法。

の抽出用としては、液式カーボネート類、例えば1,2-プロピレンカーボネート(米国特許第4,101,538号参照)；クロロホルム(米国特許第4,275,160号参照)；および1,2-ジクロルエタン(欧洲特許出願第151238号明細書参照)がある。

米国特許第8,275,610号明細書には、その他の固体或液体、すなわち超音波振動法、磨碎法、フレンチプレス法、洗浄/漂洗サイクル法およびリゾテウム処理法が記載されているが、前記の欧洲特許出願明細書に記載されているより、液体懸濁液(例えば水性培地内で微生物を適当な培養およびエネルギー源で培養することにより得られるような液体懸濁液)の濾過ろ過またはフランシュ洗浄でも、PHBを固体から抽出可能とするに充分な液体被膜が生じる。

これらの方法の一欠点は、PHB含有溶液を固体被膜層から分離する必要があることである。固体の寸法が微小であり、従つて液体の被膜の寸法が微小である故に、上述のような分離法には從来

3. [発明の詳細な説明]

本発明は、ボリ(β-ヒドロキシ脂肪)(以下PHBと略記する)の抽出に関する。

PHBはプラスチック材料として有用な柔軟性ポリエステルである。PHBは細胞の細胞内において粗粒状のエネルギー保存物質として多量の細胞によつて蓄積される。

PHB含有液体はそのまま吸収用材料として使用できるが(例えば米国特許第8,107,172号明細書参照)、固体物質の残渣からPHBを分離することが一般に文献に記載されている。

このようなPHB分離を行うのに提案されている各種方法の中には、アセトンでの凍結のような方法によつて細胞を破壊し、次いでPHBを可溶化溶剤で処理することにより破壊細胞から抽出する方法がある。このような方法の実例は、解剖として塩化メチレンおよびエタノールの混合物またはビリジンを用いる米国特許第8,088,955号および第8,046,942号明細書記載の方法である。細胞内で產生された形態にあるPHB用のセラ

から問題があつた。このような難点は、クロロホルムを溶剤として利用する場合におけるようにPHB含有溶液が比較的粘稠であるときに調査である。前述の欧洲特許出願明細書に記載されるように、若干の場合には、水性液体懸濁液を、適当な液体被膜工程の後に、適当なPHB溶剤と接触させ、次いで溶剤相と水性相とに分離せるとからなる逆相法によつて、PHBを抽出しうる。しかしながら溶剤/水性相の分離は遅くしかも不完全であつた。

ここに我々は、液体懸濁液を液体工程に付すならば、その凝聚に必要な処理中に充分な液体被膜が生じて液体被膜層からのPHBの抽出を可能としうることを発見した。また液体被膜の約束として、液体被膜層からのPHB含有溶液の分離が一層容易に達成しうる。

従つて、本発明によれば、PHB含有液体の水性懸濁液からPHBを分離する方法であつて、懸濁液のpHを酸での処理により2～5の範囲内に置きし、かつ懸濁液を酸性化前にアルカリで処理

してその pH を 8 ~ 12 の範囲内の値に上げ、および／または酸性化前もしくは後に 50 ~ 200 °C の範囲内の温度で加熱することにより懸濁液を凝聚させ；凝聚固体を水性液体から分離し；凝聚固体を、P HB を可溶な溶剤と接触させることにより凝聚固体から P HB を抽出し；そして P HB を溶解して含む溶剤を固体破片層から分離する；ことからなる上記 P HB 分離方法が提供される。

そのような凝聚法は実用特許第 1,062,005 号および特許第 1,881,806 号明細書に記載されている。好ましくは、懸濁液の pH を 8.5 ~ 12 の値に上げ、懸濁液中に加压スチームを射出して加热し、次いで 8 ~ 5 の pH にまで酸性化することにより懸濁液を凝聚させる。

スチームの量および圧度は、固体懸濁液の温度を 80 ~ 100 °C にまで上昇させるようなものであるのが好ましい。

被処理された固体は通常、沈降、浮遊、遠心分離または乾燥過程（例えば噴霧乾燥）により水性液体から分離しうる。

が有利であろう。

脂質抽出工程（もし採用するならば）および／または P HB 抽出工程は、適当な形に充填された凝聚固体について連続的に実施してよい。

本発明の好ましい一態様においては、脂質抽出後、例えば流動床乾燥は、凝聚固体を溶解させる。このようにすると比較的に多孔性的顆粒状物質が得られ、このものを次いで P HB 抽出用溶剤と接触させることができる。我々は、このような粒状物質を用いると、P HB がそれから容易に解消され、固体破片層が顆粒状のまま残ることを見出した。このような顆粒状の固体破片層は通常のような方法によって、P HB 含有溶液から容易に分離できる。脂質抽出後の凝聚固体の乾燥によって得られる多孔性顆粒物質は、P HB 用溶剤をその顆粒物質内部に下向きに通過させて実施する結果（トリクル）抽出法に特に適当である。

本発明の別の態様においては、凝聚固体を、前述のような脂質抽出工程に対し、脂質抽出溶剤から分離し、次いで水に再スラリー化させる。かく

P HB 抽出用溶剤との接触前に、凝聚固体を、液体と簡便した形で溶解しうるが P HB を溶解しない溶剤と接触させるのが好ましい。そのような脂質抽出用溶剤の例としてはメタノールおよびアセトンがある。脂質の抽出は、井通、例えば 40 ~ 90 °C で行うのが好ましいけれども、若干の場合には一層低い例えば 25 ~ 40 °C の温度でも充分な脂質抽出を行いうることがある。一般的には昇温の使用が好ましく、上記のような昇温を用いる場合には、凝聚固体は脂質抽出用溶剤中で沈降し易く、かくしてデカンテーションのような方法での凝聚固体と脂質抽出溶剤の分離を助長する傾向がある。

固体を次いで P HB 抽出用溶剤と接触させる。好ましい抽出用溶剤の例としては、1,2-ジクロロエタン、塩化メチレンおよびクロロホルムがある。脂質抽出予備処理を行わない場合には、P HB の抽出は約 40 °C 以下の温度で行うのが好ましいが、脂質抽出予備処理を行う場合は一層高い温度、例えば 50 ~ 90 °C の温度を用いるの

して得られるスラリーは、水と非混相であるが、P HB を溶解しうる液体をそのスラリーに添加することにより、逆式抽出法（前述の欧洲特許出願第 1,512,8号明細書参照）で処理しうる。

一般的には、さらに追加の固体破片層（例えば前述の欧洲特許出願第 1,512,8号明細書に記載する場合に使用するための提案されているミーリング処理）は、凝聚固体が一旦脂質抽出工程に付された場合には不要である。

水性スラリーを P HB 抽出用溶剤と共に搅拌した後に、二つの液相を分離させる。固体破片層は水性相に残留するが、P HB は無用相中に溶解される。前述の P HB 抽出用溶剤、すなわちクロロホルム、1,2-ジクロロエタンおよび塩化メチレンを、この逆式法により P HB を抽出するのに使用できる。

逆式抽出前に脂質除去工程を行いうので、二つの液相間でのエマリジョンの形成は防止され、両者の分離は比較的の簡単である。

P HB は、抽出溶剤の採取から、非溶媒、例え

はメタノール／水混合物中への沈殿により、または前項の発見、例えば実験またはフラッシュ乾燥により、回収できる。

本発明を以下の実施例によりさらに説明する。

実験例 1

150g/ℓのバイオマス含有（そのうちの約45wt%がPHB）のアルカリゲネス・エクトロフス (*Alcaligenes eutrophus*) の水性懸濁液を、アルカリの添加によりそのpHを9とし、90℃に10分間加熱し、次いでpH 5に酸性化することにより、凝聚させた。得られたフロックをデカンターシヨンにより水性液体から分離した。

その粗搾フロック100gを200mlのメタノールに加え5分間浸漬した。次いでデカンターシヨンによりメタノールを除去し、得られたフロックを過濾床にて60℃で20分間乾燥した。難燃状の生成物が形成された。

難燃状生成物の1.0gを200mlのクロロホルムで5分間直流処理してPHBを抽出した。固体破片層は綿球状であり、クロロホルム溶液の上面

に浮いており、容易にそこからすくい取ることができる。

PHBを含むクロロホルム溶液をメタノールと水の混合物（メタノール：水=6:1容積比）に加えることによりそのクロロホルム溶液からPHBを沈殿させた。沈殿PHBを迅速に取り出し、オーブン中も0℃で乾燥した。回収されたPHB量はアルカリゲネス・エクトロフス菌体中のそれの約8.0wt%に相当した。

回収PHBの質量平均分子量は、ゲル透析クロマトグラフィで測定して270,000であった。

比較例

比較のために、200mlのクロロホルムで10gの乾燥菌体（上記水性懸濁液の噴霧乾燥により得た）を直流処理することによりPHB抽出した。固体破片層は微細粒子状であり、このものはクロロホルム溶液から非常に困難に溶解できた。

実験例 2

実験例1を繰返したが、クロロホルムで抽出状物を溶解する代りに難燃状物をシルバーソン・

ミキサー中にクロロホルムと室温で混合した。固体破片層は、比較例2よりもクロロホルム溶液から容易に分離できたが、実験例1の場合よりも分離が困難であつた。

回収PHBの量は、菌体中のそれの約5.0wt%に相当した。

実験例 3

米国特許第8,085,959号明細書には濃縮液体をアセトンで処理してから、PHB抽出用溶剤で抽出することが提案されている。示唆されているアセトンの量は、菌体重量の1~10倍である。

アセトンの効果を検討するため、約5重量%の菌体（そのうちの約5.0wt%がPHB）を含む水性懸濁液の試料に対し、異なる量のアセトンを添加し、それらの混合物を室温で2分間攪拌した。

試料	アセトン wt%	固体懸濁液 wt%	結果
A	1.0	9.0	難めうる効果なし。
B	5.0	5.0	菌体は部分的に溶解した外観を呈したが、實相からの菌体の分離は生じなかつた。
C	9.0	1.0	菌体は部分的に溶解した外観を呈したが、9.0%の外観を占めて沈降した。

該菌体または菌体懸濁液をアセトンで処理する場合、大規模操業ではアセトン／水性媒質混合物からアセトンを回収する必要が生ずるであろうから、乾燥菌体に対するアセトンの効果を検討した。

噴霧乾燥菌体（比較例で用いたもの）、または空気乾燥菌体（すなわち実験例1で用いた懸濁液から遠心分離およびも0℃の空気中での過濾床乾燥により分離した菌体）の種々の量を、100mlのアセトンと共に室温で2分間かきませ、その溶液を1時間静置した。菌体は溶解した外観を有

しないが、下表に示すようにある程度まで圧縮した。

試料	液体のタイプ	当体の量	沈降固体の量
(イ)	(ガ)	(イ)	(ガ)
D	噴霧乾燥	2	無
E	*	5	約2
F	*	10	約8
G	風乾	8	無
H	*	5	約1
I	*	10	約5~6

第1頁の続き

優先権主張 ②1980年12月23日③イギリス
(G B)④8041182

②発明者 パーリー・アルダーソン
イギリス国クリーブランド・ストックトン・オン・ティーズ・ノートン・ザ・グリーン・ストックトン・ホール(番地なし)

試料CまたはFの沈降固体をデカンターシヨンで分離し、乾燥し、クロロホルムで煮沸処理したとき、クロロホルム溶液からの固体破片層の分離は比較例よりも容易ではなかつた。

特許出版人 インペリヤル・ケミカル・インダストリーズ・リミテッド

代理人 井端士 清 俊 三
(外2名)